

ネッタイシマカにおけるジカウイルス伝播機構の解明

Molecular mechanisms underlying Zika virus transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes

所属機関：フランス パスツール研究所 代表研究者氏名：鳥居 志保

研究期間：2021年6月1日～2022年5月31日

滞在研究機関： Department of Virology, Institut Pasteur,
75724 Paris, France

共同研究者等： Dr. Louis Lambrechts

The public health response to emerging mosquito-borne viral diseases is often inefficient, because the causative agents are recognized and the prevention measures are deployed, only after the disease has spread. To predict which viruses and mosquitoes have the highest potential to cause future outbreaks, understanding the mechanisms determining the virus susceptibility of mosquitoes and the mosquito transmissibility of viruses is needed. In this study, I propose a two-pronged approach to identify both the viral and mosquito factors involved in molecular compatibility between the human pathogenic Zika virus and its main vector *Aedes aegypti* by combining my skills in molecular virology with the host lab's expertise in mosquito experimental infections in vivo. First, I attempted to identify the mosquito factors regulating virus susceptibility by comparison of virus-binding mosquito proteins between two mosquito strains displaying different levels of Zika virus susceptibility. Second, I used an innovative reverse genetics system to create chimeric Zika viruses from two parental virus strains with different levels of mosquito transmissibility and attempted to identify the viral genes required for efficient transmission by mosquitoes. Together, this project will provide important new insights into vector-virus specificity and significantly improve our understanding of mosquito-borne virus emergence.

研究目的

ジカウイルスやデングウイルスに代表されるように新興、再興の蚊媒介性ウイルス感染症は次から次へと発生し、公衆衛生上の大問題を引き起こしてきました。しかしながら多くの場合、感染症の原因となるウイルスは世界的に流行してから初めて認識されるため、ワクチンや抗ウイルス薬の開発などは遅れをとってきました。今後発生し得る新たな感染症に素早く対応するためには、将来起こり得る蚊媒介性ウイルス感染症を予測することが重要です。

世界各地には数千種類もの蚊が存在しており、多様なウイルスが生息していることが知られています。その一方で、ごく一部の種類の蚊のみが、一部のウイルスを哺乳動物へ伝播することができ、故に蚊媒介性ウイルス感染症が発生します。例えばヤブ蚊属蚊はジカウイルスやデングウイルスを伝播する一方

で、イエカ属蚊は日本脳炎ウイルスやウエストナイル熱ウイルスを伝播します。マラリアを媒介するハマダラカ属蚊は上記のいずれのウイルスも媒介しません。即ちウイルスと、ウイルスを伝播し得る蚊が適合することが、ウイルス感染症が発生する重要な条件となっております。しかしながらその分子機構は明らかになっておりません。そこで本研究では、蚊におけるウイルス伝播の分子機構を解明することを目的とします。本研究でウイルスの伝播能力を規定する遺伝子マーカーを発見することは、将来発生する蚊媒介性ウイルス感染症を予測するための一助となることが期待できます。

研究経過

本研究ではジカウイルスと、その主要ベクターであるネッタイシマカに着眼して研究を進めていくこ

とに致しました。まず、ウイルスの感染感受性を決定するネッタイシマカの遺伝子同定を試みました。パスツール研究所の Louis Lambrechts 博士らは、アフリカに生息するネッタイシマカより、アフリカ以外の地域に生息するネッタイシマカの方がウイルス感染感受性が高いことを明らかにしました (Aubry F. et al., Science, 2020)。そこで、ウイルスの感受性が異なる 2 種のネッタイシマカに的中腸において、ジカウイルスに結合するタンパク質をプロテオミクス解析により、網羅的に同定し、比較することに致しました。本年度、我々はパスツール研究所のプロテオミクス解析プラットフォームチームとの話し合いを重ね、解析手順を詳細に決定致しました。マウスより吸血させた蚊の中腸を回収した後、キャリブレーションにより溶解させます。その後、超遠心により精製、濃縮したジカウイルス粒子と反応させます。その後、ウイルスタンパク質間の相互作用を安定させるため、化学的クロスリンクを実施します。ウイルス結合タンパク質を効率よく回収するため、ウイルスの表面タンパク質を認識する抗体と反応させた後、フローサイトメトリーを用いて、ウイルス-タンパク質コンプレックスを収集します。更に、粒子のサイズを認識する NanoFCM を用いて、ウイルス-タンパク質コンプレックスをタンパク質非結合ウイルス粒子から分類し、コンプレックスの数を合わせて Mass spectrometry を実施します。現在までにフローサイトメトリー解析に適切な抗体を同定し、NanoFCM がジカウイルス粒子を分類することができることを確認できました。引き続き、細かい実験条件を確定し、解析を実施する予定です。

次に、蚊への伝播効率を決定するジカウイルス遺伝子を同定することを試みました。Louis Lambrechts 博士らは、アジアで分離されたジカ熱ウイルスの方が、アフリカで分離されたジカ熱ウイルスよりも蚊に伝播されにくいことを発見致しました (Aubry F. et al., Nature commun., 2021)。そこで、蚊における伝播効率が異なる 2 種のジカウイルスのキメラウイルスを作出し、キメラウイルスの伝播効率を比較することに致しました。ジカウイルスのゲノムは一本鎖 RNA で、構造タンパク質、非構造タンパク質をコードします。そこで、キメラウイルスは非構造タンパク質、構造タンパク質または非翻訳領域がそれぞれ

入れ替わるように設計し、野生型と合わせて 8 種類準備することに致しました。研究者は PCR のみで簡単にジカウイルスを作出する方法を Lambrechts 研究室で立ち上げ、上記の 8 種類のキメラウイルスの作出に成功致しました。野外で分離されたウイルスと実験室で作出した野生型のウイルスをそれぞれ蚊に感染させ、ウイルス感染率や伝播効率を比較した結果、同様の性質を示すことが明らかとなりました。また、それぞれのウイルスを細胞に感染させ形成するプラークサイズを比較したところ、構造タンパク質、非構造タンパク質を入れ替えたキメラウイルスは、プラークサイズが変化しました。今後は作出したキメラウイルスを蚊に感染させ、伝播効率の違いから、伝播に関与するウイルス遺伝子領域を同定する予定です。

考察

現段階では実験のセットアップが終了した段階ではありますが、すでに 8 種のキメラウイルスを作出し、各性質が異なることを見出しました。本研究課題の遂行にあたり、代表研究者は当初の目的通り、蚊におけるウイルス実験技術を習得することができました。さらにパスツール研究所内外の研究者との共同研究や口頭発表を通して蚊やウイルスの研究を牽引する研究者達と知り合うことができ、将来の目標とする国際舞台で活躍する感染症研究者となるための国際的なネットワークを構築することができました。今後、本研究課題を通して、さらに分子生物学的な解析技術を習得すると共に、自身が研究主宰者となるためのトレーニングに励みたいと思います。

研究の発表

口頭発表

1. パリ日本人研究会、2022 年 4 月 29 日、パリ、フランス
2. Journées Départementales 2022、2022 年 5 月 17 日、パリ、フランス

研究に關与する資金獲得歴

MSCA Postdoctoral fellowship, Horizon Europe Framework Programme (HORIZON) 195,914.88 €
2023 年 1 月 1 日開始予定